



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

O ecossistema vaginal

Pedro Valente Aguiar

Junho 2017



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

O ecossistema vaginal

Pedro Valente Aguiar

Orientado por:

Dr. Joaquim Silva Neves

Junho 2017

RESUMO

A comunidade científica tem empenhado em compreender os mecanismos através dos quais os microorganismos coabitam no ser humano e as respectivas implicações na origem de patologias, sendo que conceitos como “*mutualismo*” e “*simbiose*” permitem melhor entender as interações existentes entre o hospedeiro e os agentes colonizadores.

Num largo espectro de doenças com origem no desequilíbrio entre o hospedeiro e os microbiotas, o ecossistema vaginal surge como uma fonte de estudo para melhor compreensão das mesmas e portanto, a necessidade de aprimorar a aprendizagem da composição do microbiota vaginal e perceber que não existe necessariamente um ecossistema normal ou anormal, tendo em conta que vários são os factores que proporcionam as condições para o aparecimento de doença.

Os resultados obtidos em diferentes estudos apontam para a existência de certos microbiotas mais associados à patologia do foro ginecológico. Consequentemente releva-se a importância que os novos métodos de diagnóstico e identificação do microbioma poderão vir a ter no futuro da prática clínica, ao permitirem maior personalização da abordagem preventiva e terapêutica.

Palavras-chave: Microbiota, Microbioma, *Lactobacillus*, Oncobioma, Metaboloma

O trabalho final exprime a opinião do autor e não da Faculdade de Medicina de Lisboa.

ABSTRACT

For several decades the scientific community has tried to understand mechanisms through which microorganisms cohabit within the human body and their implications on disease pathogenesis. Thus, concepts such as “*mutualism*” and “*symbiosis*” have paramount importance to grasp the relationship between the host and its colonizing agents.

A better knowledge concerning vaginal microbiota can therefore help to understand a wide range of pathologies arising from the imbalance between host and microorganisms.

The greater need for vaginal microbiome better understanding included that no particular vaginal microbiota can be considered itself normal or abnormal since disease is related with different factors and the results have shown that certain microbiotas are indeed associated with an increase in gynecological pathology.

As a consequence it is relevant to highlight the importance that new means of microbiome diagnosis and identification may achieve in the future clinical care, by allowing a more personalized approach to disease prevention and treatment.

Keywords: Microbiota, Microbiome, *Lactobacillus*, Oncobiome, Metabolome

Aos meus pais, pois sem eles nada seria possível.

O autor desta Tese optou pela não utilização do novo Acordo Ortográfico.

ÍNDICE

Índice	Página 1
Lista de Abreviaturas	Página 2
Métodos de Pesquisa	Página 3
Introdução	Página 4
Resultados	Página 5
-1-Composição e estrutura do ecossistema vaginal	Página 5
-2-Mecanismos de defesa do ecossistema vaginal	Página 9
-3-Ecossistema vaginal; aspectos clínicos	Página 13
A estabilidade e diversidade microbianas	Página 13
Vaginose bacteriana	Página 15
Displasia cervical (alto grau e baixo grau) e cancro do colo do útero	Página 18
-4-O microbioma vaginal e o futuro	Página 22
-5-O metaboloma vaginal	Página 23
Conclusão	Página 25
Bibliografia	Página 26
Figuras	Página 31
Agradecimentos	Página 36

LISTA DE ABREVIATURAS

CST - Community State Types

ARN - Ácido ribonucleico

rARN – Ácido ribonucleico ribossomal

EMMPRIN- Indutor da metaloproteinase da matriz extracelular

MMP - Metaloproteinase da matriz

HPV - Vírus do papiloma humano

IST - Infecções sexualmente transmissíveis

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

HSV - Vírus do *herpes simplex*

VB - Vaginose bacteriana

ADN - Ácido desoxirribonucleico

LSIL – Lesão intraepitelial de baixo grau

HSIL – Lesão intraepitelial de alto grau

NMR - Ressonância magnética nuclear

GHB - Ácido gama-hidroxibutírico

MÉTODOS DE PESQUISA

Para a realização deste trabalho foram pesquisados artigos científicos em língua inglesa durante o período de Outubro de 2016 a Fevereiro de 2017 utilizando o motor de busca livre *PubMed*. Foram investigados termos como “*vaginal microbiome*”, “*bacterial vaginosis*”, “*oncobiome*”, “*metabolome*” e “*dysbiosis*”.

INTRODUÇÃO

O objectivo deste trabalho consiste numa revisão actualizada sobre os novos conhecimentos adquiridos relacionados com a composição do microbiota vaginal, incluindo os novos métodos para identificação dos respectivos constituintes.

Pretende-se verificar a relação entre o ecossistema vaginal e a patologia ginecológica, tentando introduzir conceitos recentes no estudo do microbioma vaginal.

De realçar que não obstante os avanços actuais, ainda existem aspectos a esclarecer, sobretudo a variabilidade microbiana em termos funcionais e morfológicas entre as diferentes mulheres e como os diferentes componentes do ecossistema vaginal interagem mutuamente e com o hospedeiro, e quais as implicações dessa interação na patogénese de doenças de carácter ginecológico.

Nota:

Microbiota: conjunto de microorganismos residentes num determinado ecossistema ^[1].

Microbioma: comunidade residente de microorganismos e respectivos genomas num determinado ecossistema conjuntamente com as condições ambientais locais ^[1].

RESULTADOS

1. Composição e estrutura do ecossistema vaginal

Desde a descoberta do bacilo de *Döderlein* em 1892, sabe-se que os *Lactobacillus* são constituintes fundamentais do microbiota vaginal na maioria das mulheres e recentemente a colonização por parte destes microorganismos era considerada como essencial para que se pudesse considerar como saudável determinado ecossistema [2,3,4,5,6,7].

Com os novos métodos de diagnóstico e avanços no conhecimento acerca da constituição da comunidade microbiana vaginal, esta ideia encontra-se ultrapassada. Diversos grupos de mulheres cujos ecossistemas vaginais são ricos em *Lactobacillus*, de facto são saudáveis do ponto de vista ginecológico, sendo que resultados de estudos recentes apontam para que 27% das mulheres possuam microbiomas vaginais predominantemente colonizados por outro tipo de microorganismos [2,4,5].

Os dados do estudo realizado por *Ravel* e colaboradores utilizando as novas técnicas de análise e sequenciação de genes 16S rARN, permitiu diferenciar pelo menos cinco tipos diferentes de microbiomas vaginais em 394 mulheres assintomáticas de idade reprodutiva, denominados por *Community State Types (CST)* [2,4,5]. A análise do mesmo estudo revelou que as espécies mais abundantes no microbioma de uma mulher saudável em idade fértil, parecem ser em primeiro lugar os *Lactobacillus Iners* (presentes em 83,5% das amostras), seguindo-se as espécies *Lactobacillus crispatus* (64,5%), *Lactobacillus jensenii* (48,2%) e *Lactobacillus gasseri* (42,9%) [2,4,5].

Os *CST* I, II, III e V são globalmente dominados por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus jensenii* respectivamente,

apresentando pouca heterogeneidade microbiana ^[2,4,5] (Figura 1). O CST IV, que pode ainda ser subdividido em CST IV-A e IV-B, está associado a maior diversidade.

O CST IV-A apresenta apenas baixa quantidade de *Lactobacillus*, coabitando estes em conjunto com bactérias estritamente anaeróbias ou facultativas tais como *Anaerococcus*, *Corynebacterium*, *Finegoldia* e *Streptococcus* ^[2,4,5] (Figura 1).

O CST IV-B é praticamente desprovido na totalidade de *Lactobacillus* sendo os respectivos componentes mais abundantes: os géneros *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella*, *Mobiluncus* e *Peptoniphilus* ^[2,4,5]. O tipo de composição microbiana deste CST é o habitualmente associado à vaginose bacteriana (definida por *scores* de *Nugent*, em que 7 a 10 corresponde a infecção no exame cultural). No entanto, falta compreender as razões pelas quais em grande número de mulheres, estes microbiomas não estão associados a qualquer sintomatologia ou patologia ^[2,4,5].

Ainda segundo *Ravel* e colaboradores, o CST-IV é o mais prevalente entre mulheres de origem africana (38,9%) e ascendência latinoamericana (34,3%) ^[2,4,5] (Figura 2). Assim, se o predomínio por parte dos *Lactobacillus* parece estar associado a microbiomas saudáveis em mulheres caucasianas ou asiáticas, o mesmo não se verifica em mulheres de outras origens étnicas, relevando assim o facto de não existir um microbiota ou microbioma saudável *per se* ^[2,4,5].

Outros géneros e espécies bacterianos, como *Listeria*, *Streptococcus alfa-hemolíticos* e *Ureaplasma Urealyticum* e fungos como *Candida Albicans*, podem também fazer parte de microbiotas saudáveis ^[4,5,8]. A colonização por *C. Albicans* ocorre sobretudo em mulheres cujas microbiotas são dominados por *Lactobacilli* ^[9]. No entanto, a presença destes microorganismos e a respectiva percentagem em cada mulher variam, e o conhecimento é restrito quanto à importância e cointegração no ecossistema vaginal ^[2].

Se os microorganismos constituintes dos *CST* previamente supracitados são de facto os mais predominantes na vagina durante a idade reprodutiva da mulher, sem embargo, o ecossistema vaginal é mutável temporalmente ao longo da vida da mesma, sendo que as espécies que o coabitam parecem depender dos níveis hormonais circulantes [4,10,11,12].

Assim, após o nascimento e ainda sob efeito dos estrogénios maternos, o ecossistema vaginal é constituído essencialmente por *Lactobacillus*, situação que se reverte após as primeiras quatro semanas de vida com o desaparecimento desse efeito hormonal, sendo substituído por um microbiota extremamente diverso, que perdura até à puberdade [4,10,11].

Com o início da menarca e consequente produção de estrogénios, novamente os *Lactobacillus* tornam-se os micróbios dominantes. A predominância dos mesmos aumenta ainda mais durante a gravidez, como seria expectável dado os elevados níveis de estriol e estradiol em circulação, sendo este um período de relativa estabilidade microbiana [13,14,15,16]. Ao contrário da gravidez, o puerpério está associado a maior diversidade à medida que os níveis hormonais diminuem de forma abrupta [4,11,15].

Finalmente, após a menopausa ocorre de novo o aumento da multiplicidade bacteriana, inclusive em mulheres em que a colonização vaginal pode existir por parte de microorganismos oriundos da flora fecal [4,12,13]. Neste período, o microbiota contém características quanto à constituição muito semelhantes aos da infância ou da vaginose bacteriana, adquirindo novamente um pH quase neutro (cerca de 6,5 a 7) [12,13].

Para além da variabilidade atribuível às mudanças fisiológicas da mulher com a idade, o microbiota vaginal é também sensível a alterações mais abruptas com potencial interferência na constituição, como a utilização de lubrificantes vaginais, terapêutica hormonal (contraceptiva ou não), actividade sexual, fase do ciclo menstrual, duches vaginais, antibioterapia e alterações imunitárias do organismo feminino [2,4,12].

Estas alterações são capazes de alterar a constituição e o normal funcionamento do microbiota e podem vir a corresponder manifestações clínicas [2,4,12,13,14].

2. Mecanismos de defesa do ecossistema vaginal

Para a salvaguarda contra infecções urogenitais e disbiose, existem mecanismos de defesa capazes de garantir o saudável funcionamento da comunidade microbiana vaginal.

Como previamente abordado, os *Lactobacillus* são os agentes dominantes na maioria dos microbiotas em mulheres saudáveis e são os elementos em que a maioria do conhecimento sobre este tópico se concentra [2,4,5].

As hormonas femininas estão envolvidas no aparecimento de microbiotas dominados por *Lactobacillus*, no entanto, o processo através do qual isso ocorre ainda não está perfeitamente elucidado, mas parece certo que estes microorganismos dependem da acumulação de glicogénio no epitélio vaginal sob estímulo estrogénico [4,11,13].

A fermentação da glicose oriunda da glicogenólise em ácido láctico, origina à criação de um pH vaginal ácido (cerca de 3,5 a 4,5) tornando a colonização por microorganismos indesejáveis mais difícil [2,4,13,17]. Forma-se assim um ciclo em que a existência de um meio ácido beneficia a proliferação dos *Lactobacilli* que, são responsáveis pela produção de mais ácido láctico [2,17].

O ácido láctico é um composto quiral com dois isómeros. O isómero “D-ácido láctico” é comumente gerado por *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri*. O isómero “L-ácido láctico” é formado pelo e no epitélio vaginal ou por *L.iners* e outros anaeróbios associados a disbiose vaginal [4,13].

Os resultados do estudo realizado por *Watkin* e colaboradores, mostram maior rácio do isómero L em relação ao isómero D ocorrente com frequência nos *CST* III e IV, o que resulta na indução de uma metaloproteinase da matriz extracelular (EMMPRIN) e activação da metaloproteinase da matriz (MMP-8) com efeitos deletórios na integridade do epitélio cervical ao causar o aumento da permissividade dos queratinócitos basais à invasão por parte do vírus papiloma humano (HPV) [4,13,18].

Relativamente à infecção pelo HPV, uma das proteínas virais com papel essencial na respectiva transformação, a E5, é particularmente susceptível ao baixo pH vaginal [13]. O ácido láctico apresenta também acção citotóxica directa sobre as células tumorais cervicais *in vitro*, independentemente do pH [13].

Ainda sobre a infecção por HPV, o *CST*-II, rico em *L. gasseri* associa-se à maior rapidez na resolução da mesma [13,19]. Esta espécie é também responsável pela produção de gasserina, uma bacteriocina com atividade protectora contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas [13,14]. Posteriormente, descobriu-se que *L. crispatus* e *L. reuteri* também são capazes de produzir gasserina [13,14]. As bacteriocinas são substâncias com propriedades bactericidas produzidas por diversas espécies de *Lactobacillus*, sendo que para além da gasserina, se destacam as lactocinas e crispasinas [2].

Dentro do género *Lactobacillus*, comunidades vaginais dominadas por *L. Crispatus* apresentam o pH vaginal mais baixo, sendo estes últimos os maiores produtores de ácido láctico [4,5]. Esta espécie tem a particularidade de ser dominante quando presente em determinado microbioma, inibindo a colonização por outras espécies e estando associado a menores taxas de infecção por agentes causadores de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), incluindo o HPV [13,14].

Para a manutenção de um ambiente ácido vaginal, contribui a produção por microorganismos dos ácidos fórmico, acético, propiónico e succínicos ^[4].

O ácido láctico apresenta uma função microbicida de largo espectro, tendo o efeito superior à acidez vaginal isolada, na proteção da mulher contra o VIH e *Neisseria Gonorrhea*, apresentando efeitos microbicidas contra a *Escherichia coli* uropatogénica e HSV-2 ^[2].

A estimulação do sistema imune inato através da libertação de interleucinas parece ser também outra das funções do ácido láctico, nomeadamente do isómero L-ácido láctico. ^[2]

O facto de os *Lactobacillus iners* serem os menores produtores de ácido láctico entre o género, poderá explicar o porquê do CST-III ser o que com mais frequência transita para o CST-IV, indiciando que a espécie *Lactobacillus iners* tem de facto características que a diferenciam das demais espécies de *Lactobacilli* ^[4,5,12]. Desconhece-se ainda o motivo da incapacidade de inibir a proliferação de outros anaeróbios ou se pelo contrário, os mesmos se adaptam de tal forma a outro tipo de ambientes que lhes permita estabelecer em basicamente todos os ecossistemas vaginais ^[4].

Adicionalmente, a produção dos compostos maltose, maltotriose e maltotetraose a partir do glicogénio por parte da enzima alfa-amilase presente no epitélio vaginal beneficia a colonização pelos *Lactobacillus* porque esses sacarídeos fomentam o respectivo crescimento ^[12].

No que concerne ao peróxido de hidrogénio, composto produzido por certas espécies de *Lactobacilli* e no passado relacionado a proteção contra patogénios associados a vaginose bacteriana, os dados dos estudos indicam que *in vivo* os efeitos poderão ser

mais nefastos do que benéficos, e a proteção concedida pelos *Lactobacillus* aparenta basear na produção de ácido láctico [2,4,20].

Os *Lactobacilli*, com excepção dos *Lactobacillus iners* produzem pépticos com acção protectora, nomeadamente biosurfactantes capazes de inibirem a formação de biofilmes e adesão da *Gardnerella Vaginalis* ao epitélio vaginal [13,14].

Tal como a composição do microbiota, o pH vaginal varia de acordo com a origem étnica, sendo que os dados dos estudos apontam para o pH mais elevado em mulheres africanas (4,7) e latinoamericanas (5,0) em relação a mulheres de caucasianas (4,2) ou asiáticas (4,4) [2,4,5].

Novamente e em seguimento do que fora abordado anteriormente, este achado contesta a visão previamente estabelecida de que para a ocorrência de comunidade vaginal saudável seria necessário a presença de um meio ácido e colonização por *Lactobacilli*. Para corroborar este facto parece que a produção de ácido láctico não é exclusiva dos *Lactobacillus*, pois espécies como *Atopobium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Megasphaera*, e *Leptotrichia* o podem produzir, contribuindo assim para a criação de ecossistemas funcionais [2,4].

3. Ecossistema vaginal e os aspectos clínicos

A estabilidade e diversidade microbianas

Pretende-se estabelecer a relação entre determinados microbiomas (*CST*) e as consequências do respectivo desequilíbrio para a aquisição de patologia urogenital, nomeadamente infecções e neoplasia do colo do útero.

De realçar que a limitação para a melhor compreensão desta relação consiste no facto de a maioria dos estudos realizados serem apenas transversais e não longitudinais, não permitindo analisar as variações do microbiota vaginal ao longo do tempo nas mulheres em estudo, dificultando assim o estabelecimento de relações de causalidade entre determinada alteração da flora e a patologia ^[2,4,5,13].

Não obstante esta limitação, parece evidente que determinados ecossistemas apresentam maior resistência (definida como a capacidade de manter a dinâmica funcional estável que lhes permite resistir a eventos potencialmente agressivos) e maior resiliência (definida como a capacidade de voltar rapidamente à normal homeostase comunitária local após agressão potencialmente causadora de disbiose) ^[4,12].

Um exemplo clássico de estabilidade do microbioma ocorre na gravidez, período durante o qual parece haver menos transição entre *CST* e quando ocorrem muito esporadicamente envolvem o *CST-IV* ^[3,12]. Particularmente o *CST IV-B*, extremamente parco em *Lactobacillus* raramente foi detectado em mulheres com partos de termo ^[16].

Ainda sobre o período da gravidez, se os níveis de *Lactobacillus iners* permanecem inalterados em grávidas e não grávidas, nas primeiras ocorre maior abundância de *Lactobacillus jensenii*, *crispatus* e *gasseri* em comparação com as últimas ^[12].

Este aumento de estabilidade durante a gravidez estará provavelmente associado ao surto exponencial de estrogénios em circulação conferindo à grávida uma comunidade microbiana vaginal mais resistente e resiliente com todos os benefícios clínicos, nomeadamente maior proteção contra infecções urogenitais que constituem um factor de risco para complicações obstétricas, incluindo parto pré-termo ^[2,12].

Ao contrário da gravidez, a menstruação constitui um período de maior instabilidade, com impacto na resiliência e resistência dos microbiomas, inclusive o *CST-I*, mais estável sob o domínio dos *Lactobacillus crispatus* que transitam para uma comunidade com predomínio dos *Lactobacillus iners* ^[4,12].

Nas fases folicular tardia e luteal do ciclo menstrual apresentam microbiotas menos diversos e mais estáveis, situação certamente associada ao incremento hormonal ^[2,12].

Vaginose bacteriana

A vaginose bacteriana (VB) consiste numa disbiose polimicrobiana vaginal com elevada prevalência em mulheres de idade fértil, constituindo a patologia da vagina mais comum neste grupo etário [2,21,22].

A depleção de *Lactobacillus* conjuntamente com a concomitante proliferação de outros microorganismos anaeróbios como: *Gardnerella Vaginalis*, *Atopobium Vaginae*, *Bacteroides*, *Mobiluncus*, *Megasphaera*, *Prevotella* e *Mycoplasma Hominis*, responsáveis pela produção de aminas, está na origem da sintomatologia associada, nomeadamente o corrimento vaginal esbranquiçado de odor fétido com pH vaginal superior a 4,5 [2,21].

A etiologia da VB permanece ainda por esclarecer, mas existem factores de risco para a ocorrência que se associam a situações potencialmente agressivas para a estabilidade do microbiota como: a menstruação, os duches vaginais, a introdução de novo parceiro sexual ou as relações sexuais com diferentes parceiros e a realização de antibioterapia recente. O tabagismo surge como factor de risco independente [2,21,23].

Como principal factor protector contra a VB surge a contracepção hormonal combinada ou somente progestativa, reduzindo a recorrência (31%), a incidência (18%) e a prevalência (32%) [12]. Em segundo plano, a utilização frequente do preservativo parece ter um efeito positivo na diminuição da incidência de VB [21].

O diagnóstico da VB é clínico (critérios de *Amsel*) ou preferencialmente usando parâmetros laboratoriais com o *score* de *Nugent* [2,7,24] (Figuras 3 e 4). Os *CST* dominados por *Lactobacillus crispatus* e *jensenii* associam-se a *scores* de *Nugent* mais baixos (1 a 3) enquanto comunidades predominantes de *Lactobacillus iners* e *gasseri*

relacionam-se com *scores* de *Nugent* intermédios (4 a 6) ou diagnósticos de VB (7 a 10) [2,7,24].

Os *CST* I e V apresentam mais estabilidade e menor diversidade microbiana, e é possível supor estes dois factores como protectores contra a disbiose originária de VB mas falta ainda esclarecer porque é que mulheres com comunidades vaginais com extrema diversidade microbiana permanecem assintomáticas. Para além dos factores de risco anteriormente citados, elementos imunitários, culturais e a etnicidade poderão contribuir para a manifestação desta patologia, o que sugere a etiologia multifactorial no princípio da VB [2,21].

As consequências clínicas das complicações associadas à VB ou a elevados *scores* de *Nugent* (7 a 10) mesmo em mulheres assintomáticas, incluem maior predisposição a IST, à infecção por HIV, à *Chlamydia* ou *Neisseria gonorrhoeae*, e o maior risco de parto pré-termo, à doença inflamatória pélvica (endometrite, salpingite) e à susceptibilidade aumentada de aquisição de infecções após realização de procedimentos cirúrgicos ginecológicos [2,7,25,26].

Tendo em conta a potencial gravidade clínica da VB urge então reconhecer as causas da respectiva gênese e quais as mulheres mais predispostas a adquirirem esta condição.

Como referido anteriormente, cerca de 25% das mulheres são saudáveis não obstante possuírem comunidades vaginais parcas em *Lactobacillus*. Os critérios diagnósticos da VB de *Nugent* baseiam-se precisamente na ausência do complexo *Lactobacillus Acidophilus* e proliferação de outro tipo de anaeróbios. Existirá uma tendência para o sobrediagnóstico desta condição [2]. Adicionalmente, e sublinhando a sensibilidade não muito elevada dos meios de diagnóstico da VB (70% para *Amsel* e 89% para *Nugent*) quase metade das mulheres com critérios de *Nugent* positivos para VB estão assintomáticas, dificultando ainda mais o estabelecimento de indicações para se realizar antibioterapia [2,7].

A VB surge então como um grande desafio para a compreensão do funcionamento dos ecossistemas vaginais e para melhor esclarecer as causas da VB serão necessários estudos prospectivos que permitam vigiar grupos de mulheres ao longo do tempo atentando em comportamentos de risco para estabelecer quais as que apresentam mais risco de desenvolverem VB sintomática e para estabelecer medidas de prevenção ^[2,21].

Displasia cervical (alto grau e baixo grau) e cancro do colo do útero

O cancro cervical é a sétima neoplasia mais frequente nas mulheres em todo o mundo e a mais frequente nos países em desenvolvimento ^[14,27,28]. Este facto releva a importância das medidas de prevenção e tratamento das lesões precursoras e com a introdução relativamente recente da vacinação contra as estirpes mais oncogénicas do vírus papiloma humano (HPV 16 e 18) é expectável a redução da incidência desta neoplasia pois, esses dois subtipos são responsáveis por cerca de 65 a 75% dos casos de carcinoma invasivo/invasor ^[14,29].

A probabilidade de uma mulher adquirir uma infecção com origem no HPV ao longo da vida é de 80% ^[14]. No entanto, mais de 90% destas infecções resolvem-se espontaneamente pelo organismo através do sistema imunitário inato e consequentemente uma pequena proporção de mulheres virá a desenvolver lesões malignas ou precursoras.

Os maiores factores de risco para a persistência da infecção são o tabagismo, a multiparidade, a imunodeficiência, a infecção por *Chlamydia trachomatis* e a utilização de contraceptivos orais por longos períodos de tempo ^[13,14,30].

Por conseguinte, se a infecção pelo HPV é absolutamente necessária para o desenvolvimento desta neoplasia na grande maioria dos casos, outros factores estão envolvidos no processo associado à permanência do vírus e consequentes lesões, sendo que parece mais evidente a importância do microbioma como factor de protecção ou predisposição para o desenvolvimento desta patologia ^[13,14].

O pico de incidência da infecção por HPV ocorre aos 20 anos de idade, o que poderá dever-se à maior imaturidade do epitélio cervical em adolescentes e jovens adultas ^[14].

A maior abundância durante este período da vida feminina por parte da *Gardnerella Vaginalis* nos microbiomas do tipo *CST* IV poderá contribuir para a maior susceptibilidade à persistência da infecção ^[13].

Como previamente referido, apenas um pequeno grupo de mulheres virá a desenvolver lesões precursoras após a infecção pelo HPV, sendo que um número ainda menor virá efectivamente a ter lesões de carácter maligno. Este processo de carácter inflamatório é insidioso, com duração variável mas que pode demorar pelo menos duas décadas, sendo que desconhece-se se a inflamação crónica ocorre da contribuição dos microbiomas com potencial oncogénico ou se pelo contrário é a própria inflamação que induz à formação de *CST* de risco ^[13,14] (Figura 5). Os resultados dos estudos procuraram estabelecer a relação entre *CST* e a infecção por HPV através dos novos métodos de sequenciação e amplificação do ADN.

A investigação realizada por *Lee* e colaboradores revela que mulheres HPV positivas apresentam maior diversidade bacteriana em relação a mulheres sem HPV, apresentando menor proporção de *Lactobacillus* ^[13,14,31]. Os dados deste estudo apontam igualmente para a possibilidade da espécie *Sneathia* vir a ser considerada um marcador microbiológico da infecção por HPV ^[13,14,31].

Os resultados do estudo de *Mitra* e colaboradores que analisaram 169 mulheres com histologia positiva para lesões cervicais pré-invasivas e invasivas, constataram que em comparação com mulheres saudáveis, as primeiras apresentavam a incidência duas, três e quatro vezes maior de *CST*-IV quando portadoras de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma invasivo/invasor, respectivamente ^[14,32]. Concomitantemente a ausência de *CST*-I associou-se a maior gravidade das lesões, o que pode indiciar este *CST* como protector contra o HPV ^[14,32].

Estes achados são corroborados pela análise de *Audirac-Chalifour* e colaboradores, em que mulheres com lesões precursoras apresentaram maior diversidade microbiana em relação a mulheres sem doença ^[33].

No mesmo estudo, identificou-se a presença de *Anaerococcus vaginae*, *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus iners* na ausência de *Lactobacillus crispatus* como a combinação de maior risco para o desenvolvimento de lesões precursoras ^[33].

Os resultados apresentados por *Oh* e colaboradores associam microbiomas com escassez de *Lactobacillus crispatus* e plenos de *Atopobium vaginae* ao risco seis vezes superior ao normal de aquisição de LSIL e HSIL ^[34].

Se estes dados estão limitados por outros factores, desde a ausência de longitudinalidade e ajuste dos factores de risco à utilização do subjectivo *score* de *Nugent* para definição de disbiose, é crescente a evidência associando maior diversidade microbiana e a redução dos géneros de *Lactobacillus*, com a excepção dos *Lactobacillus iners*, ao aumento predisposição, à persistência da infecção por HPV e ainda, maior gravidade das lesões ^[13,14,32].

Tendo em conta estas plausíveis associações entre determinados microbiotas e neoplasias que se aplicam não somente ao carcinoma invasivo/invasor do colo do útero, mas aos cancros do tracto gastrointestinal, nomeadamente o carcinoma gástrico e colorrectal e assim surgiu o conceito de oncobioma. Este define-se como o conjunto de microbiomas em que a constituição e metabolismo estarão implicados no aparecimento de determinadas neoplasias ^[35]. No caso particular do microbioma vaginal, e tendo em conta que a vagina é colonizada por vírus, o conceito de viroma constituiu assim uma fonte de estudo integrada no oncobioma ^[13,14].

A ser obtida uma relação de causa e efeito entre determinados microbiomas e a promoção de displasia e neoplasia o impacto na clínica seria enorme e permitiria uma abordagem mais orientada com vista à prevenção e terapêutica precoce de mulheres cujo microbioma vaginal apresentasse características oncogénicas e salienta-se assim a importância da realização de estudos longitudinais ^[13,14].

4. O microbioma vaginal e o futuro

Os grandes avanços feitos nos últimos anos acerca do conhecimento do ecossistema vaginal deveram-se em grande parte aos novos métodos diagnósticos capazes de identificar mais detalhadamente os componentes vaginais. Previamente, e na ausência da sequenciação e amplificação de genes 16 S rARN, a aquisição de conhecimentos acerca dos constituintes de determinado microbiota e respectiva taxonomia baseava-se na cultura de microorganismos ^[2].

Este processo era extremamente moroso e não identificava parte a grande maioria dos microorganismos pois apenas uma pequena percentagem destes eram passíveis de cultura ^[2].

O que é previsível com a nova tecnologia ao dispor através das abordagens metagenómicas, metabonómicas, metabolómicas e metaproteinómicas é de conseguir maior personalização do microbiota vaginal, permitindo determinar quais as mulheres em risco de desenvolver patologia ginecológica e subsequentemente a vigilância e o tratamento mais direcionados.

Um exemplo da utilidade desta maior personalização poderia advir do uso de prebióticos e probióticos dirigidos a determinado microbiota de risco, contribuindo para a resolução de um tipo de disbiose com potencial infeccioso ou oncogénico ^[14,36,37].

5. O metaboloma vaginal

Um dos conceitos mais recentes no estudo dos microbiomas em geral e do microbioma vaginal em particular, é o de metabolómica. Segundo *Marchesi e Ravel*, a metabolómica descreve as abordagens analíticas usadas para determinar o perfil metabólico de determinado tecido ou estirpe microbiana ^[1]. O metaboloma é definido como o conjunto de todos os metabólitos presentes num determinado sistema ^[1].

A análise do metaboloma vaginal através de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR) baseia-se no entendimento de que a disbiose vaginal induz à produção de metabólitos distintos dos que normalmente ocorrem num ecossistema considerado como saudável.

Os dados do estudo realizado por *Laghi* e colaboradores avaliaram as mudanças do metaboloma de um grupo de mulheres com VB definida pelos critérios de *Nugent* à medida que a mesma disbiose era resolvida através da administração de rifaximina tópica ^[38]. Verificou-se que nas mulheres com remissão da disbiose ocorreram alterações nos parâmetros metabólicos, com queda significativa dos níveis de alanina, acetato, prolina, putrescina, formiato entre outros metabólitos com o aumento muito substancial (17,57%) nos níveis de lactato ^[38].

Os resultados doutro estudo, por *McMillan* e colaboradores mostraram a abordagem metabolómica em 131 mulheres naturais do Ruanda para concluir que a produção dos metabólitos gama-hidroxibutirato (GHB) e 2-hidroxisovalerato se associam a maior diversidade microbiana e a VB. Particularmente a espécie *Gardnerella Vaginalis* contribuiu para a maior produção de GHB ^[39]. A produção de lactato e amino ácidos, segundo o mesmo estudo, ocorre em microbiomas pouco diversos e ricos em *Lactobacilli*. ^[39]

Finalmente, *Vitali* e colaboradores apresentam resultados de metabolitos nicotinato, malonato e acetato como marcadores de VB e sugerem a abordagem diagnóstica à VB associada à presença destes metabolitos e dos anaeróbios *Atopobium*, *M. hominis* e *Prevotella* nas secreções vaginais ^[40].

Tendo em conta estes achados e se for possível a criação de métodos diagnósticos rápidos, eficazes e economicamente viáveis é mais provável que brevemente as abordagens metabolómicas contribuam para o diagnóstico de patologia ginecológica e permitam estabelecer quais as microbiotas mais instáveis e diversos, permitindo também a monitorização da resposta a determinada terapia através da quantificação dos metabolitos.

CONCLUSÃO

Os últimos anos permitiram avanços claros quanto à compreensão da constituição do ecossistema vaginal. No entanto, apesar deste novo conhecimento quanto à estrutura, existem lacunas sobre os factores que podem condicionar a alteração do normal funcionamento.

Mais do que considerar um ecossistema vaginal como saudável com base na constituição e estrutura do microbiota, fará seguramente mais sentido atentar à funcionalidade e capacidade de providenciar um benefício fisiológico ao hospedeiro, com base nos conceitos microbiológicos de mutualismo e simbiose.

Deste modo o saudável funcionamento de um ecossistema será o resultado da estrutura microbiana em interação com factores potencialmente ajustadores do mesmo, como: etnicidade, imunidade, genética e vida sexual entre outros comportamentos com potencial de alteração do microbioma.

O grande desafio actual consiste em determinar as mulheres nas quais a combinação do microbiota e os factores supracitados vêm a constituir risco para aquisição de doença ginecológica.

Espera-se assim que com um entedimento mais aprofundado do funcionamento do ecossistema vaginal através de avanços em áreas como a metabolómica e metagenómica se consiga personalizar a abordagem às doenças com origem na disbiose microbiana vaginal, com possibilidade de orientação da prevenção ou terapêutica tendo em consideração as particularidades únicas de cada ecossistema vaginal.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Marchesi RJ, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal *Microbiome* 2015; 3:31
- 2 - Ma B, Forney LJ, Ravel J. The vaginal microbiome: rethinking health and diseases *Ann Rev Microbiol* 2012; 66: 371-389
- 3 - Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species *J Infect Dis* 1999; 180:1950–1956
- 4 - Forney Larry J, Ravel Jacques. Community Ecology and the Vaginal Microbiome. Microbial Ecology in States of Health and Disease: Workshop Summary Disponível em <https://www.nap.edu/read/18433/chapter/13> e acessado a 14 de abril de 2017
- 5 - Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108 (Suppl 1): 4680-4687
- 6 - Danielsson D, Teigen P, Moi H. The genital ecosystem: focus on microbiota and bacterial vaginosis *Ann N Y Acad. Sci.* 2011; 1230:48–58
- 7 - Martin DH. The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease *Am J Med Sci* 2012; 343(1):2-9.
- 8 - Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, et al. The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques *BJOG* 2011; 118(5):533-549.
- 9 - Liu M-B, Xu S-R, He Y, et al. Diverse Vaginal Microbiomes in Reproductive-Age Women with Vulvovaginal Candidiasis *PLoS ONE* 2013; 8(11)

- 10 - Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(26): 11971-11975
- 11 - Farage M, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina *Arch Gynecol Obstet* 2006; 273(4): 195-202
- 12 - Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota *Sci Transl Med* 2012 4(132): 132ra152
- 13 - Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, et al. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome* 2016; 4: 58
- 14 - Kyrgiou M, Mitra A, Moscick A-B. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Transl Res* 2017; 179: 168-182
- 15 - Romero R, Hassan SS, Gajer P, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women *Microbiome* 2014; 2: 4
- 16 - Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, et al. Diversity of the Vaginal Microbiome Correlates With Preterm Birth *Reprod Sci* 2014; 21(1): 32-40
- 17 - O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota *PLoS ONE* 2013 8(11):e80074. doi: 10.1371/journal.pone.0080074. eCollection
- 18 - Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, et al. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections *MBio* 2013; 4 (4): 4(4). pii: e00460-13. doi: 10.1128/mBio.00460-13

- 19 - Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, et al. Association between the vaginal microbiota, menopause status and signs of vulvovaginal atrophy *Menopause* 2014; 21(5): 450-458
- 20 - O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide *BMC Infect Dis* 2011; 11:200
- 21 - Turovskiy Y, Noll KS, Chikindas ML The etiology of bacterial vaginosis *J Appl Microbiol* 2011; 110(5):1105-1128
- 22 - Machado A, Cerca N. Influence of Biofilm Formation by *Gardnerella vaginalis* and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis *J Infect Dis* 2015;212, 12, 1856
- 23 - Hellberg D, Nilsson S, Mårdh PA Bacterial vaginosis and smoking *Int J STDs and AIDS* 2000; Sep; 11(9):603-6
- 24 - Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN. Diversity of Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(15):4898-4909
- 25 - Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al Bacterial Vaginosis Assessed by Gram Stain and Diminished Colonization Resistance to Incident Gonococcal, Chlamydial, and Trichomonal Genital Infection *J Infect Dis* 2010; 202(12):1907-1915
- 26 - Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, et al. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:139–147
- 27 - Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 *Int J Cancer* 2015; 136: E359–86

- 28 - Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Lyon, France: GLOBOCAN 2012 *International Agency for Research on Cancer World Health Organization* 2012. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>, acessado a 7 de maio de 2017
- 29 - Basu P, Banerjee D, Singh P, Bhattacharya C, Biswas J. Efficacy and safety of human papillomavirus vaccine for primary prevention of cervical cancer: A review of evidence from phase III trials and national programs *South Asian J Cancer* 2013; 2(4):187-192
- 30 - Dempsey AF. Human Papillomavirus: The Usefulness of Risk Factors in Determining Who Should Get Vaccinated *Rev Obstet Gynecol* 2008; 1(3):122-128
- 31 - Lee JE, Lee S, Lee H, et al. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort *PLoS One* 2013; 8:e63514
- 32 - Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity *Sci Rep* 2015; 5: 16865
- 33 - Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Roman M, et al. Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: a pilot study *PLoS One* 2016; 11(4): e0153274
- 34 - Oh HY, Kim BS, Seo SS, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 674. e1–e9
- 35 - Thomas RM, Jobin C. The Microbiome and Cancer: Is the “Oncobiome” Mirage Real? *Trends Cancer* 2015; 1:24-35

- 36 - Cribby S, Taylor M, Reid G. Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008; 256490.4
- 37 - Vujic G, Jajac KA, Despot SV, et al. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo controlled study *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 168: 75–9
- 38 - Laghi L, Picone G, Cruciani F, et al. Rifaximin Modulates the Vaginal Microbiome and Metabolome in Women Affected by Bacterial Vaginosis *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (6): 3411-3420
- 39 - McMillan A, Rulisa S, Sumarah M, et al. A multi-platform metabolomics approach identifies highly specific biomarkers of bacterial diversity in the vagina of pregnant and non-pregnant women *Sci. Rep.* 2015; 5, Article number:14174
- 40 - Vitali B, Cruciani F, Picone G. et al. Vaginal microbiome and metabolome highlight specific signatures of bacterial vaginosis *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 2367

FIGURAS

Figura 1: Mapa de calor com a percentagem dos microorganismos presentes nas amostras de 394 mulheres de idade fértil. [2]

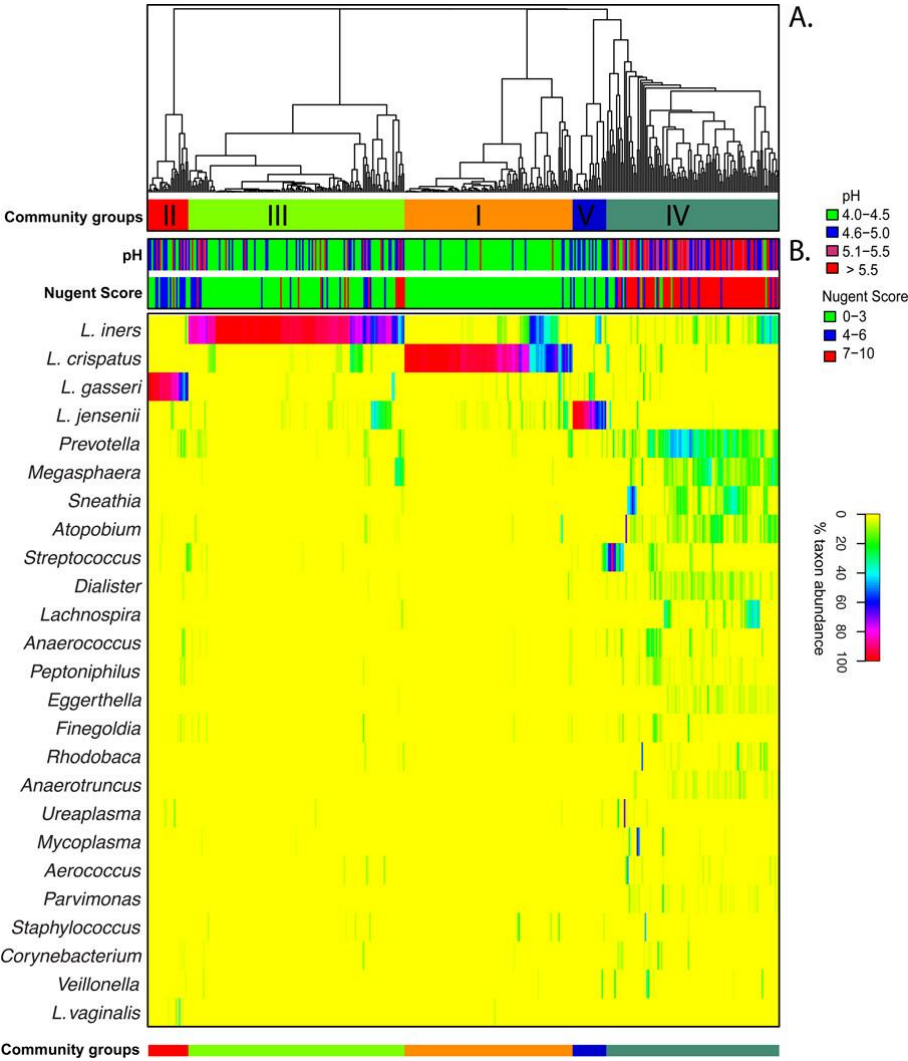


Figura 2: Distribuição dos *Community State Types* (CST) de acordo com a etnicidade.^[4]

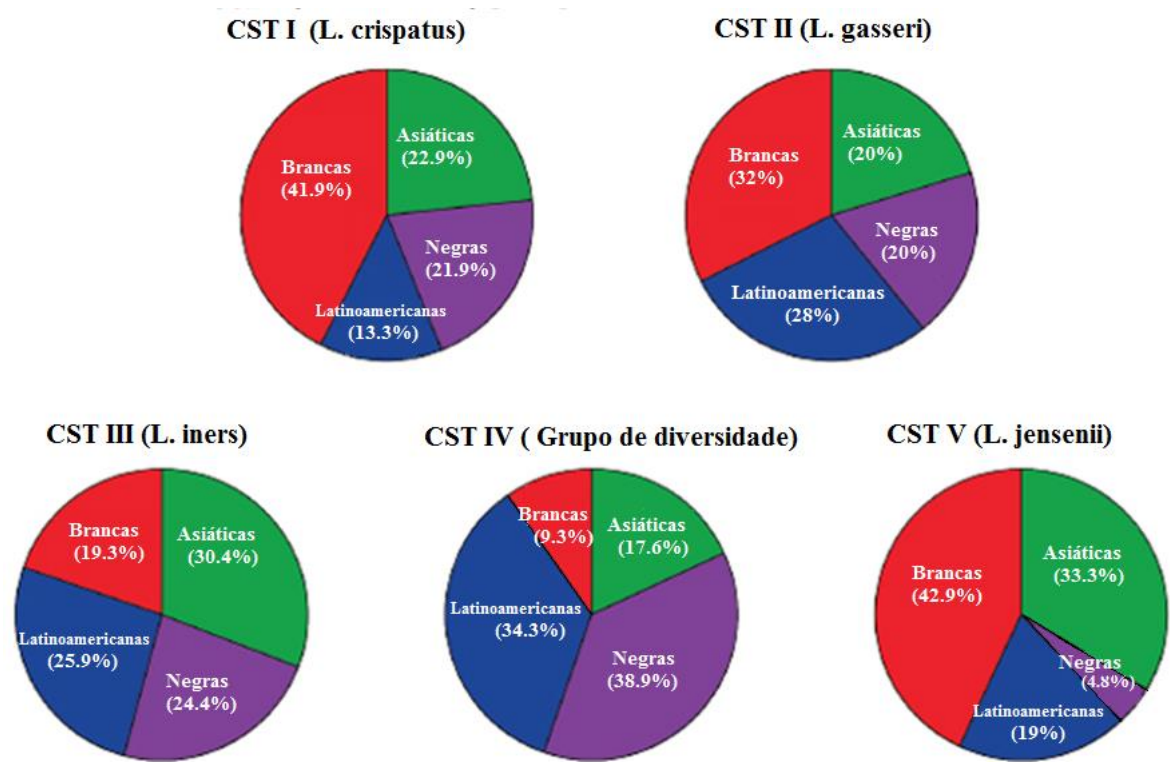


Figura 3:

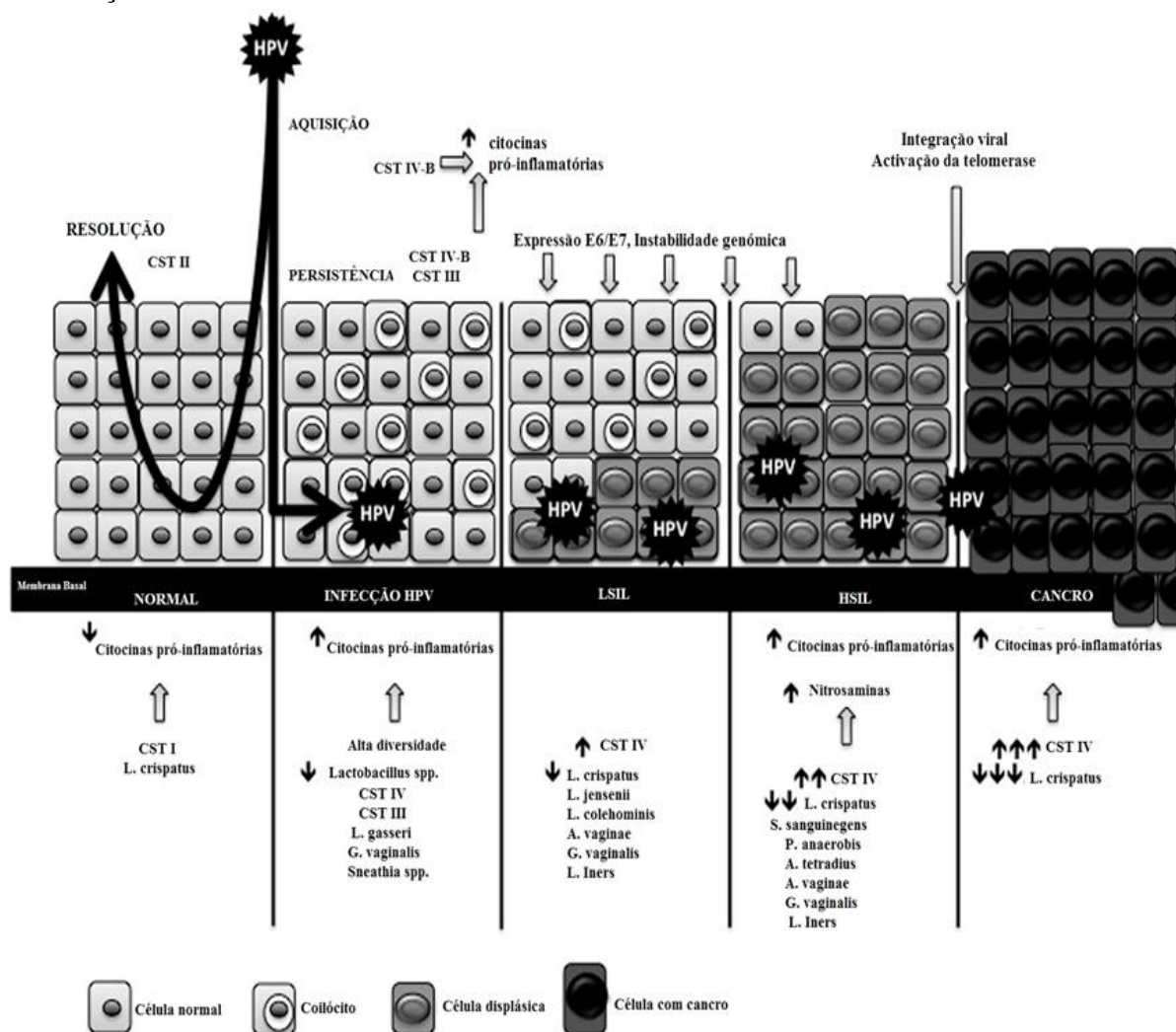
Critérios de Amsel (pelo menos 3 dos 4)
Positividade no teste das aminas
Ter um pH vaginal superior a 4,5
Presença de células guia (<i>clue cells</i>)
Fluxo vaginal homogéneo, com cor branco – acinzentado

Figura 4:

CrITÉRIOS de *Nugent* simplificados

Grau 1	Padrão Normal (<4)	Predomínio de <i>Lactobacillus</i> ; poucos microorganismos do tipo <i>Gardnerella Vaginalis</i> , <i>Mobiluncus</i> e anaeróbios
Grau 2	Padrão intermediário (4-6)	Diminuição no número de <i>Lactobacillus</i> com aumento do número de outros micróbios
Grau 3	Vaginose Bacteriana (7-10)	Ausência de <i>Lactobacillus</i> , predominio de patogénios do tipo anaeróbio e <i>Gardnerella</i>

Figura 5: Interações entre HPV, Microbioma e factores imunitários promotoras ou protectoras contra a infecção por HPV e respectivos impactos na progressão da inflamação. [14]



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Doutor Joaquim Silva Neves pela orientação deste trabalho e pelo seu tempo e dedicação.

Gostaria também de agradecer à minha namorada, Paulina, por todo o apoio durante a realização deste trabalho.